



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

PCT/EP

02008840

Office européen
des brevets

REC'D 13 JUN 2003

WIPO PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02008840.7

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

BEST AVAILABLE COPY



Anmeldung Nr.:
Application no.: 02008840.7
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 19.04.02
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Verfahren zur Diagnose von Entzündungserkrankungen und Infektionen unter
Bestimmung des Phosphoproteins LASP-1 als Inflammationsmarker

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)

Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

G01N33/48

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

EPD - Munich
33
19. April 2002

Dipl.-Chem. Dr. Steffen ANDRAE
Dipl.-Phys. Dieter FLACH
Dipl.-Ing. Dietmar HAUG
Dipl.-Chem. Dr. Richard KNEISSEL
Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing. Friedrich BAUER
Dipl.-Phys. Dr. Martin FRIESE
Balanstraße 55
81541 München

Unser Aktenzeichen: 3677

Anmelderin: B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft

**Verfahren zur Diagnose von Entzündungserkrankungen und
Infektionen unter Bestimmung des Phosphoproteins LASP-1
als Inflammationsmarker**

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verwendungen des Proteins LASP-1 für die medizinischen Diagnostik von Entzündungserkrankungen und Infektionen, insbesondere von Sepsis und sepsisähnlichen systemischen Infektionen sowie von Entzündungserkrankungen, die im Gehirn lokalisiert sind oder die auf das Gehirn übergreifen. Sie beruht auf dem erstmaligen Nachweis stark erhöhter Konzentrationen des Proteins LASP-1 im Gehirngewebe von Primaten, bei denen experimentell durch Toxinverabreichung eine Sepsis bzw. systemische Entzündung hervorgerufen wurde.

Die vorliegende Erfindung hat ihren Ursprung in intensiven Forschungsarbeiten der Anmelderin im Zusammenhang mit weiteren Verbesserungen der Diagnose und Therapie von Entzündungen und Infektionen.

Als Entzündungen (Inflammationen) werden ganz allgemein bestimmte physiologische Reaktionen eines Organismus auf verschiedenartige äußere Einwirkungen wie z.B. Verletzungen,

Verbrennungen, Allergene, Infektionen durch Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze und Viren, auf Fremdgewebe, die Abstoßungsreaktionen auslösen, oder auf bestimmte entzündungsauslösende endogene Zustände des Körpers, z.B. bei Autoimmunerkrankungen und Krebs, bezeichnet. Entzündungen können als harmlose, lokal begrenzte Reaktionen des Körpers auftreten, sind jedoch auch typische Merkmale zahlreicher ernster chronischer und akuter Erkrankungen von einzelnen Geweben, Organen, Organ- und Gewebsteilen.

Lokale Entzündungen sind dabei meist Teil der gesunden Immunreaktion des Körpers auf schädliche Einwirkungen, und damit Teil des lebenserhaltenden Abwehrmechanismus des Organismus. Wenn Entzündungen jedoch Teil einer fehlgeleiteten Reaktion des Körpers auf bestimmte endogene Vorgänge wie z.B. bei Autoimmunerkrankungen sind und/oder chronischer Natur sind, oder wenn sie systemische Ausmaße erreichen, wie beim systemischen Inflammationssyndrom (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) oder bei einer auf infektiöse Ursachen zurückzuführenden schweren Sepsis, geraten die für Entzündungsreaktionen typischen physiologischen Vorgänge außer Kontrolle und werden zum eigentlichen, häufig lebensbedrohlichen Krankheitsgeschehen. Als Erkrankung, die von typischen Symptomen einer Entzündung, und zwar des Gehirns, begleitet wird, ist auch die Alzheimer Krankheit anzusehen, die durch eine in der Regel im 5. bis 6. Lebensjahrzehnt auftretende, unaufhaltsam fortschreitende Großhirnrindenatrophie charakterisiert ist und aufgrund ihrer Häufigkeit eine große volkswirtschaftliche Bedeutung aufweist.

Es ist heute bekannt, dass die Entstehung und der Verlauf von entzündlichen Prozessen von einer beträchtlichen Anzahl von Substanzen, die überwiegend proteinischer bzw. peptidischer Natur sind, gesteuert werden bzw. von einem mehr oder weniger zeitlich begrenzten Auftreten bestimmter Biomoleküle begleitet sind. Zu den an Entzündungsreaktionen beteiligten endogenen Substanzen gehören insbesondere solche, die zu den

Cytokinen, Mediatoren, vasoaktiven Substanzen, Akutphasenproteinen und/oder hormonellen Regulatoren gezählt werden können. Die Entzündungsreaktion stellt eine komplexe physiologische Reaktion dar, an der sowohl das Entzündungsgeschehen aktivierende endogene Substanzen (z.B. TNF- α , Interleukin-1) als auch desaktivierende Substanzen (z.B. Interleukin-10) beteiligt sind.

Bei systemischen Entzündungen wie im Falle einer Sepsis bzw. des septischen Schocks weiten sich die entzündungsspezifischen Reaktionskaskaden unkontrolliert auf den gesamten Körper aus und werden dabei, im Sinne einer überschießenden Immunantwort, lebensbedrohlich. Zu den gegenwärtigen Kenntnissen über das Auftreten und die möglichen Rolle einzelner Gruppen endogener entzündungsspezifischer Substanzen wird beispielsweise verwiesen auf A.Beishuizen, et al., "Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock", Advances in Clinical Chemistry, Vol.33, 1999, 55-131; und C.Gabay, et al., "Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation", The New England Journal of Medicine, Vol.340, No.6, 1999, 448-454. Da sich das Verständnis von Sepsis und verwandten systemischen entzündlichen Erkrankungen, und damit auch die anerkannten Definitionen, in den letzten Jahren gewandelt haben, wird außerdem verwiesen auf K.Reinhart, et al., "Sepsis und septischer Schock", in: Intensivmedizin, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.New York, 2001, 756-760; wo eine moderne Definition des Sepsis-Begriffes gegeben wird. Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung werden die Begriffe Sepsis bzw. entzündliche Erkrankungen in Anlehnung an die Definitionen verwendet, wie sie den genannten drei Literaturstellen entnommen werden können.

Während wenigstens im europäischen Raum die durch eine positive Blutkultur nachweisbare systemische bakterielle Infektion lange den Sepsisbegriff prägte, wird die Sepsis heute in erster Linie als systemische Entzündung verstanden, die infektiöse Ursachen hat, als Krankheitsgeschehen jedoch

große Ähnlichkeiten mit systemischen Entzündungen aufweist, die durch andere Ursachen ausgelöst werden. Dem genannten Wandel des Sepsis-Verständnisses entsprechen Veränderungen der diagnostischen Ansätze. So wurde der direkte Nachweis bakterieller Erreger durch komplexe Überwachungen physiologischer Parameter und in jüngerer Zeit insbesondere auch durch den Nachweis bestimmter am Sepsisgeschehen bzw. am Entzündungsgeschehen beteiligter endogener Substanzen, d.h. spezifischer "Biomarker", ersetzt bzw. ergänzt.

Von der großen Zahl von Mediatoren und Akutphasenproteinen, von denen man weiß oder vermutet, dass sie an einem Entzündungsgeschehen beteiligt sind, eignen sich dabei für diagnostische Zwecke insbesondere solche, deren Auftreten sehr spezifisch für entzündliche Erkrankungen bzw. bestimmte Phasen oder Ausprägungen entzündlicher Erkrankungen ist, deren Konzentrationen sich drastisch und diagnostisch signifikant verändern und die außerdem die für Routinebestimmungen erforderlichen Stabilitäten aufweisen und hohe Konzentrationswerte erreichen. Für diagnostische Zwecke steht dabei die zuverlässige Korrelation von Krankheitsgeschehen (Entzündung, Sepsis) mit dem jeweiligen Biomarker im Vordergrund (gute Spezifität und Selektivität), ohne dass dessen Rolle in der komplexen Kaskade der am Entzündungsgeschehen beteiligten endogenen Substanzen bekannt sein muss.

Eine bekannte, als Sepsis-Biomarker besonders geeignete endogene Substanz ist Procalcitonin. Procalcitonin ist ein Prohormon, dessen Serum-Konzentrationen unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung infektiöser Ätiologie (Sepsis) sehr hohe Werte erreichen, während es bei Gesunden so gut wie nicht nachweisbar ist. Hohe Werte an Procalcitonin werden außerdem in einem relativ frühen Stadium einer Sepsis erreicht, so dass sich die Bestimmung von Procalcitonin auch zur Früherkennung einer Sepsis und zur frühen Unterscheidung einer infektiös bedingten Sepsis von schweren Entzündungen, die auf anderen Ursachen beruhen, eignet. Die

Bestimmung von Procalcitonin als Sepsismarker ist Gegenstand der Veröffentlichung M.Assicot, et al., "High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection", The Lancet, vol.341, No.8844, 1993, 515-518; und der Patente DE 42 27 454 C2 bzw. EP 0 656 121 B1 bzw. US 5,639,617. Auf die genannten Patente und in der genannten Veröffentlichung angeführten frühen Literaturstellen wird zur Ergänzung der vorliegenden Beschreibung ausdrücklich Bezug genommen. In den letzten Jahren ist die Zahl der Veröffentlichungen zum Thema Procalcitonin stark angestiegen. Stellvertretend für zusammenfassende Veröffentlichungen aus jüngerer Zeit wird daher noch verwiesen auf W.Karzai et al., "Procalcitonin - A New Indicator of the Systemic Response to Severe infection", Infection, Vol. 25, 1997, 329-334; und M.Oczenski et al., "Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period", European Journal of Anaesthesiology 1998, 15, 202-209; sowie ferner H.Redl, et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol.28. No.11, 3659-3663; und H.Redl, et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", in: Sepsis 1998; 2:243-253; und die darin zitierten weiteren Literaturstellen.

Die Verfügbarkeit des Sepsismarkers Procalcitonin hat der Sepsisforschung starke Impulse gegeben, und es werden gegenwärtig intensive Anstrengungen unternommen, weitere Biomarker zu finden, die die Procalcitonin-Bestimmung ergänzen können und/oder zusätzliche Informationen für Zwecke der Feindiagnostik bzw. Differentialdiagnostik zu liefern vermögen. Erschwert wird die Suche nach potentiellen neuen Sepsis-Biomarkern allerdings dadurch, dass häufig noch sehr wenig oder nichts über die genaue Funktion bzw. über die genauen Gründe für das Auftreten bestimmter endogener Substanzen, die am Entzündungs- oder Infektionsgeschehen beteiligt sind, bekannt ist.

Die Ergebnisse der experimentellen Überprüfung eines fruchtbaren rein hypothetischen Ansatzes zur Ermittlung weiterer potentieller Sepsismarker finden sich in DE 198 47 690 A1 bzw. WO 00/22439. Dort wird gezeigt, dass bei Sepsis nicht nur die Konzentration des Prohormons Procalcitonin erhöht ist, sondern auch für andere Substanzen, die zu den Peptid-Prohormonen gerechnet werden können, signifikant erhöhte Konzentrationen beobachtet werden können. Während das beschriebene Phänomen gut dokumentiert ist, sind die Ursachen für den Anstieg der Konzentrationen von Prohormonen bei Sepsis weiterhin weitgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Anmeldung werden Ergebnisse eines anderen, rein experimentellen Ansatzes für die Suche nach weiteren entzündungs- bzw. sepsisspezifischen Biomolekülen berichtet. Auch diese experimentellen Untersuchungen nehmen ihren Ausgang bei der Bestimmung von Procalcitonin im Zusammenhang mit systemischen entzündlichen Reaktionen infektiöser Ätiologie. So war sehr früh beobachtet worden, dass bei Sepsis das Procalcitonin offensichtlich nicht auf die gleiche Weise gebildet wird, wie dann, wenn es Vorläufer für das Hormon Calcitonin ist. So wurden hohe Procalcitoninspiegel auch bei Patienten beobachtet, denen die Schilddrüse entfernt worden war. Deshalb kann die Schilddrüse nicht dasjenige Organ sein, in dem Procalcitonin bei Sepsis gebildet bzw. ausgeschüttet wird. In den Veröffentlichungen H.Redl, et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol.28. No.11, 3659-3663; und H.Redl, et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", Sepsis 1998; 2:243-253; werden die Ergebnissen von experimentellen Untersuchungen berichtet, die der Klärung der Bildung von Procalcitonin bei Sepsis dienen sollten. In den genannten Arbeiten wird durch Endotoxinverabreichung an Primaten (Paviane) eine künstliche Sepsis erzeugt, und es wird bestimmt, bei welchen experimentell erzeugten Zuständen die höchsten Procalcitoninkonzentrationen im Blut erreicht

werden. Eine Weiterentwicklung des in den genannten Arbeiten beschriebene Versuchstiermodells dient im Rahmen der vorliegenden Anmeldung dazu, neue endogene entzündungs- und/oder sepsisspezifische Biomarker von peptidischer bzw. proteini-scher Natur zu ermitteln, deren Auftreten für bestimmte Formen von Entzündungen und/oder Sepsis charakteristisch ist und die daher eine spezifische Sepsisdiagnose ermöglichen. Das Primatenmodell wurde dabei aufgrund der sehr großen Ähnlichkeit der Physiologie von Primaten und Menschen und der hohen Kreuzreaktivität mit vielen therapeutischen und diagnostischen humanen Reagenzien gewählt.

Da die bei Entzündungen gebildeten endogenen Substanzen Teil der komplexen Reaktionskaskade des Körpers sind, sind derartige Substanzen außerdem nicht nur von diagnostischem Interesse, sondern es wird gegenwärtig auch mit erheblichem Aufwand versucht, durch Beeinflussung der Entstehung und/oder der Konzentration einzelner derartiger Substanzen therapeutisch in das Entzündungsgeschehen einzugreifen, um die zum Beispiel bei Sepsis beobachtete systemische Ausbreitung der Entzündung möglichst frühzeitig zu stoppen. In diesem Sinne sind nachweislich am Entzündungsgeschehen beteiligte endogene Substanzen auch als potentielle therapeutische Targets anzusehen. Versuche, ansetzend an bestimmten Mediatoren des Entzündungsgeschehens dieses positiv therapeutisch zu beeinflussen, sind beschrieben beispielsweise in E.A.Panacek, "Anti-TNF strategies", Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung; Nr.2, 2001, 4-5; T.Calandra, et al., "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor", Nature Medicine, Vol.6, No.2, 2000, 164-170; oder K.Garber, "Protein C may be sepsis solution", Nature Biotechnology, Vol.18, 2000, 917-918. Angesichts der bisherigen eher enttäuschenden therapeutischen Ansätze besteht ein hohes Interesse daran, weitere möglichst entzündungs- bzw. sepsisspezifische endogene Biomoleküle zu identifizieren, die auch als therapeutische Targets neue Erfolgsaussichten für die Ent-

zündungsbekämpfung eröffnen.

Die vorliegende Erfindung beruht darauf, dass sich in Primaten und Menschen bei infektiös bedingten Entzündungen im cytoplasmatischen Gehirngewebe das stark überexprimierte Protein LASP-1 in einer löslichen Form nachweisen lässt, und zwar im Unterschied zu Gesunden bzw. Unbehandelten, bei denen es nicht oder nur in Konzentrationen an der analytischen Nachweisgrenze gefunden wird, und auch im Unterschied zu anderen Körpergeweben septischer Primaten-Versuchstiere, was dieses Protein für die Entzündungsdiagnostik und Infektions- bzw. Sepsisdiagnostik mit Gehirnbeteiligung geeignet macht.

Die Verwendungen in der Diagnostik, die sich aufgrund des erstmals nachgewiesenen gehirnspezifischen Auftretens von LASP-1 bei der experimentellen Simulation von Entzündungen bzw. Sepsis ergeben, werden nachfolgend noch näher beschrieben.

Die Ansprüche 1 bis 9 definieren die sich ergebenden neuen Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, und bevorzugter Ausführungsformen davon, näher.

Wie nachfolgend im experimentellen Teil noch näher ausgeführt wird, beruht die Erfindung darauf, dass nach experimenteller Auslösung einer künstlichen Sepsis in Pavianen durch Endotoxinverabreichung (LPS aus *Salmonella Typhimurium*) und 2D-gelektrophoretischer Aufarbeitung von Gehirngewebe der behandelten Tiere als eines der nur bei den behandelten Tieren identifizierbaren Produkte das Protein LASP-1 gefunden werden konnte, das außerdem nur im Gehirngewebe in erheblich erhöhter Konzentration beobachtet wurde. Zu seiner Identifizierung wurde ein neuer Proteinspot, der nur im Gehirngewebe der behandelten Tiere gefunden wurde und gemäß Gelektrophorese ein Molekulargewicht von etwa 36 ± 3 kDA und einen isoelektrischen Punkt von ca. 6,6-7,0 aufwies,

ung in Bruchstücke zerlegt, die auf an sich bekannte Weise massenspektrometrisch analysiert wurden. Durch Vergleich mit dem bekannten Massenspektrum des trypsinbehandelten Proteins LASP-1 wurde das Protein des isolierten Spots als LASP-1 identifiziert.

Die Identifizierung des in dem Proteinspot gefundenen Produkts wird im experimentellen Teil näher beschrieben, wobei die beschriebene Identifizierung nach anerkannten Interpretationsgrundsätzen als sichere Identifizierung des Produkts als LASP-1 anzusehen ist.

Das rechnerisch ermittelte Molekulargewicht der Peptidkette von LASP-1 (vgl. SEQ ID NO:1; 261 Aminosäuren) beträgt 29 717 Dalton. LASP-1 liegt jedoch physiologisch in post-translational prozessierter Form (glykosyliert und phosphoryliert) vor. So wurde das später als LASP-1 bezeichnete Produkt ursprünglich als ein 40 kDA cAMP-abhängiges Phosphoprotein ("pp40") in Magenwandzellen identifiziert (vgl. C.S. Chew et al., Journal of Cell Science 113, 2035-2045 (2000); C.S. Chew et al., Am.J.Physiol. 275 (Cell Physiol. 44): C56-C67, (1998)).

Die Aminosäuresequenz des als LASP-1 bezeichneten Phosphoproteins wurde ursprünglich als die des putativen Expressionsprodukts der cDNA eines in humanen Brustkrebs-Zelllinien überexprimierten Gens "MLN 50" aus dem Bereich q11-q21.3 des Chromosoms 17 ermittelt (C.Tomasetto et al., FEBS Letters 373 (1995): 245-249; C.Tomasetto et al., Genomics 28: 367-376 (1995); I.Bièche et al., Cancer Res. 56: 3886-3890 (1996)). Der Name LASP-1 geht darauf zurück, dass in diesem Protein erstmals eine sog. LIM-Domäne (eine aus verschiedenen Proteinen bekannte Zn-bindende Domäne; vgl. A.Hammarström et al., Biochemistry 1996, 35, 12723-12732) mit einer aus der rezeptorunabhängigen sog. src-Kinase, einer Tyrosin-Kinase, bekannten Domäne (SH3) kombiniert ist (LIM and SH3 Protein); vgl. auch Brian K. Kay et al., FASEB J. 14,

231-241 (2000).

LASP-1-mRNA ist ubiquitär in normalen Zellen nachweisbar (z.B. Prostata, Leber, Muskel, Gehirn, verschiedenen Zell-Typen) und wird in einem gewissen prozentualen Anteil von Brustkrebsfällen überexprimiert. Es wurde festgestellt, dass LASP-1 ein Actin-bindendes Protein ist, für das angenommen wird, dass es zu den Cytoskelett-assoziierten Proteinen zu zählen ist und für die Zellform und -beweglichkeit sowie möglicherweise die Signalübertragung von Bedeutung ist. Es ist auch in Nervenenden nachweisbar. LASP-1 wird durch Detergentien nur schwer solubilisiert. In vitro hat sich LASP-1 als Substrat erwiesen, dass sich hervorragend mit der cAMP-abhängigen Serin/Threonin-Kinase PKA phosphorylieren läßt. LASP-1 weist in unterschiedlichen Epithel-Zelltypen unterschiedliche Expressionsmuster auf (vgl. C.S. Chew et al., Journal of Cell Science 113, 2035-2045 (2000); C.S. Chew et al., Am.J.Physiol. 275 (Cell Physiol. 44): C56-C67, (1998)).

Das Auftreten von LASP-1 in überexprimierter Form im Gehirngewebe bei Sepsis ist von hohem wissenschaftlichen, diagnostischen und möglicherweise auch therapeutischen Interesse. Die Tatsache, dass LASP-1 ein Kinase-Substrat und Phosphoprotein ist, verleiht ihm eine gewisse Ähnlichkeit mit den sogenannten tau-Proteinen, die bei der Alzheimer Krankheit eine Rolle insbesondere für diagnostische Zwecke spielen (vgl. z.B. G.A.Jicha et al., Journal of Neurochemistry, 69., 2087-2095 (1997) und die darin zitierte Literatur; sowie EP 673 418; EP 737 208; EP 772 634; EP 610 330; und EP 618 968).

Es ist nunmehr gut bekannt, dass die Alzheimer Krankheit als gehirnspezifischer Entzündungsprozess angesehen werden kann, ohne dass damit eine Aussage bezüglich Krankheitsursache oder Krankheitsfolge gemacht werden soll (Lih-Fen Lue et al., GLIA 35:72-79, 2001; Michael Hüll et al., DDT Vol.4,

No.6: 275-282; (June 1999); F.Licastro et al., Journal of Neuroimmunologie 103 (2000), 97-102; Neuroinflammation Working Group: Haruhiko Akiyama et al., Neurobiology of Aging 21 (2000) 383-421; Michael Hüll et al., Exp.Opin.Invest.Drugs (2000) 9(4):671-683; M.Hüll et al., Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci (1996) 246:124-128; J.Rhodin et al., Annals New York Academy of Sciences, 199x, 345-352). Die Tatsache, dass das Phosphoprotein LASP-1 unter experimentellen Bedingungen, die eine Sepsis bzw. ein systemisches Entzündungsgeschehen simulieren, gehirnspezifisch in überexprimierter Form nachweisbar ist, macht es daher sehr wahrscheinlich, dass auch bei der Alzheimer Krankheit eine Überexpression von Lasp-1 bzw. einer bestimmten Expressionsform von LASP-1 beobachtbar ist und die Bestimmung von LASP-1 daher auch für die Alzheimer-Diagnostik Bedeutung erlangen wird.

Die bisherigen Publikationen zu LASP-1 deuten eine solche Möglichkeit in keiner Weise an. Es war aufgrund der bisher zugänglichen Befunde nicht zu erwarten, dass die physiologischen Konzentrationen von LASP-1 im Gehirn als Folge einer Sepsis und/oder Entzündung signifikant und nachweisbar verändert sind und daher eine Bestimmung der LASP-1-Konzentrationen im Rahmen eines Sepsisgeschehens oder einer entzündlichen Gehirnerkrankung diagnostisch von Interesse sein könnte.

Der erfindungsgemäße Nachweis von vergleichsweise hohen LASP-1-Konzentrationen im Gehirngewebe von Primaten, bei denen durch Toxinverabreichung eine künstliche Sepsis ausgelöst wurde, bei gleichzeitiger Unmöglichkeit, LASP-1 in ansonsten völlig gleich behandelten Proben von Kontrolltieren, oder in anderen Gewebeproben der septischen Tiere, zu erkennen, ist hoch signifikant. Da das Auftreten nur bei den behandelten Tieren zu beobachten war, und zwar bereits relativ kurze Zeit nach der Sepsisauslösung durch Toxinverabreichung, ist es möglich, diese Tatsache zur Schaffung

eines vielversprechenden diagnostischen Sepsis-, Infektions- und Entzündungs-Nachweisverfahrens durch Bestimmung von LASP-1 zu nutzen. Von besonderem Interesse ist außerdem eine möglich erscheinende Eignung von LASP-1 als diagnostischer Marker und Prognosemarker für die Alzheimer Krankheit.

Die Bestimmung von LASP-1 kann nach irgendeinem beliebigen geeigneten Nachweisverfahren erfolgen, wobei jedoch die Bestimmung in einer Körperflüssigkeit, einschließlich Liquor (Liquor cerebrospinalis), eines Patienten auf immundiagnostischem Wege (mittels eines Immunoassays) unter Verwendung geeigneter selektiver Antikörper unter praktischen Gesichtspunkten am vorteilhaftesten erscheint.

Aufgrund der Tatsache, dass bei einer experimentellen Sepsisauslösung erstmals das erhöhte Auftreten von LASP-1 im Gehirn nachgewiesen werden konnte, wird somit die Möglichkeit geschaffen, LASP-1 insbesondere für diagnostische Zwecke im Zusammenhang mit Entzündungen und Infektionen, die sich im Gehirn manifestieren, zu nutzen. Dafür können LASP-1 oder geeignete Teilpeptide davon ggf. auch nach Verfahren, die inzwischen zum Stand der Technik gehören, synthetisch oder gentechnologisch gezielt hergestellt werden. LASP-1-Teilpeptide, ggf. in markierter Form, können auch als Kalibratoren, Tracer und Kompetitoren für bestimmte Assayformate für immundiagnostische Bestimmungen benötigt und dafür wie erläutert hergestellt werden.

Ferner können LASP-1-Fragmente bzw. geeignete Teilsequenzen davon nach bekannten Verfahren des modernen Standes der Technik auch zur Erzeugung spezifischer polyklonaler und insbesondere monoklonaler Antikörper verwendet werden, die als Hilfsmittel für die diagnostische Bestimmung von LASP-1 in Körperflüssigkeiten eines Patienten und/oder auch als potentielle therapeutische Mittel geeignet sind. Die Erzeugung geeigneter monoklonaler Antikörper gegen bekannte Peptid-Teilsequenzen gehört heute zum allgemeinen Stand der

Technik und muss nicht besonders beschrieben werden. Ferner ist auch ausdrücklich die Antikörpererzeugung unter Anwendung von Techniken der direkten genetischen Immunisierung mit einer entsprechenden DNA zu erwähnen. Es liegt somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, zur Immunisierung z.B. eine cDNA von LASP-1 oder LASP-1-Fragmenten zu verwenden, da es sich in der Vergangenheit gezeigt hat, dass bei der Anwendung derartiger Immunisierungstechniken das Spektrum der gewinnbaren Antikörper erweitert werden kann. Es können aber auch bereits bekannte Antikörper gegen LASP-1 verwendet werden (vgl. z.B. V.Schreiber et al., Molecular Medicine 4: 675-687, 1998; C.S. Chew et al., Am.J.Physiol. 275 (Cell Physiol. 44): C56-C67, (1998)).

Da im Rahmen der vorliegend beschriebenen Arbeiten im Gel des 2D-Elektrophorese ein LASP-1-Produkt mit einer molaren Massen von ca. 36 kDa gefunden wurde, das eine für die beschriebene Bestimmung ausreichende Löslichkeit aufweist, ist zu vermuten, dass das gefundene LASP-1-Produkt eine bestimmte Art der Glykosylierung und/oder Phosphorylierung aufweist, die ihm die beobachtete Löslichkeit verleiht und aufgrund derer es sich von dem aus der Magenwand isolierten 40 kDa-Produkt signifikant unterscheidet. Es liegt daher auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, die Bestimmung von LASP-1 mit Hilfe eines spezifischen Assays durchzuführen, bei dem spezifische Glykosylierungs- und/oder Phosphorylierungsmuster erkannt werden. Die Herstellung von Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, die spezifische Glykosylierungen und/oder Phosphorylierungen erkennen, ist grundsätzlich bekannt und z.B. im Zusammenhang mit der Bestimmung bestimmter Phosphorylierungsformen der sogenannten tau-Proteine im Rahmen der Alzheimer-Diagnostik beschrieben.

Bei der immunologischen Bestimmung von LASP-1 kann dabei grundsätzlich so vorgegangen werden, wie das z.B. für die selektive Procalcitoninbestimmung beschrieben ist in

P.P.Ghillani, et al., "Monoclonal antipeptide antibodies as tools to dissect closely related gene products", The Journal of Immunology, vol. 141, No.9, 1988, 3156-3163; und P.P.Ghillani, et al., "Identification and Measurement of Calcitonin Precursors in Serum of Patients with Malignant Diseases", Cancer research, vol.49, No.23, 1989, 6845-6851. Variationen der beschriebenen Techniken und/oder weitere Immunisierungstechniken kann der Fachmann einschlägigen Standardwerken und Veröffentlichungen entnehmen und sinn- gemäß anwenden.

LASP-1 oder ggf. LASP-1-Fragmente können aufgrund der vor- liegenden Ergebnisse als spezifische Markerpeptide (Bio- marker) zum diagnostischen Nachweis und zur Verlaufskon- trolle von Entzündungen und Infektionen (insbesondere auch von systemischen Infektionen vom Sepsistyp und Entzündungen des Gehirns) dienen. Wie die Bestimmung von Procalcitonin kann dabei die Bestimmung von LASP-1 zur differentialdiagno- stischen Früherkennung und zur Erkennung sowie für die Erstellung einer Verlaufsprognose, zur Beurteilung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurtei- lung von Entzündungen und Infektionen erfolgen, wobei man bei einem derartigen Verfahren in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit, einschließlich des sog. Liquors, oder eines Gewebes eines Patienten den Gehalt von LASP-1 bestimmt und aus der festgestellten Anwesenheit und/oder Menge von LASP-1 auf das Vorliegen einer Entzündung mit Gehirnbeteili- gung oder einer Sepsis schließt und das erhaltene Ergebnis mit dem Schweregrad der Sepsis korreliert und ggf. die Behandlungsmöglichkeiten und/oder die Behandlungsaussichten abschätzt.

Besonders interessant erscheint eine Bestimmung von LASP-1 im Rahmen einer Multiparameter-Bestimmung, bei der gleich- zeitig mindestens ein weiterer Entzündungs- oder Infektions- parameter bestimmt wird und bei der ein Messergebnis in Form eines Satzes von mindestens zwei Messgrößen gewonnen wird,

eines Satzes von mindestens zwei Messgrößen gewonnen wird, der zur Feindiagnostik der Entzündung oder Infektion ausgewertet wird. Als derartige weitere Entzündungs- oder Infektionsparameter sind solche anzusehen, die aus der Gruppe der teilweise bekannten oder in den älteren bzw. parallelen Patentanmeldungen der Anmelderin offenbarten Parameter ausgewählt sind, die besteht aus Procalcitonin, CA 125, CA 19-9, S100B, S100A-Proteinen, löslichen Cytokeratin-Fragmenten, insbesondere CYFRA 21, TPS und/oder löslichen Cytokeratin-1-Fragmenten (sCY1F), den Peptiden Inflammin und CHP, Peptid-Prohormonen, der Glycin-N-Acyltransferase (GNAT), der Carbamoylphosphat Synthetase 1 (CPS 1) und deren Fragmenten und dem C-reaktiven Protein (CRP) oder Fragmenten aller genannten Proteine. Es ist vorteilhaft, die Multiparameter-Bestimmung als Simultanbestimmung mittels einer Chiptechnologie-Messvorrichtung oder einer immunchromatographischen Messvorrichtung durchzuführen, bei der die Auswertung des mit der Messvorrichtung gewonnenen komplexen Messergebnisses mit Hilfe eines Computerprogramms erfolgt.

Nachfolgend wird die Auffindung und Identifizierung von LASP-1 in näheren Einzelheiten geschildert. Die Figuren zeigen:

Fig. 1 Ansichten von 2D-Elektrophoresegelen, die einen Vergleich der Spotmuster der cytoplasmatischen Gehirnproteine eines gesunden Pavians (A) mit denen der Gehirnproteine eines Pavians 5h nach einer durch LPS-Verabreichung induzierten Sepsis (B) ermöglichen. Der Pfeil zeigt die Position des erfindungsgemäßen sepsisspezifischen Produkts (LASP-1) an, das in Darstellung (B) durch einen Kreis hervorgehoben ist;

Fig. 2 das Massenspektrum des aus dem Gel der 2D-Gelelektrophorese isolierten, trypsinverdauten Produkts.

1. Infektionssimulation durch Endotoxinverabreichung im Tiermodell (Paviane).

In Anlehnung an die mit Pavianen durchgeführten Versuche zur Stimulierung der Procalcitonin-Ausschüttung durch Endotoxininjektionen (vgl. H.Redl, et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol.28. No.11, 3659-3663; H.Redl, et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", in: Sepsis 1998; 2:243-253) wurden Pavianen (männlich, ca. 2 Jahre alt, 27 bis 29 kg schwer) jeweils 100 µg LPS (Lipopolysaccharid aus Salmonella Typhimurium, Bezugsquelle: Sigma) pro kg Körpergewicht intravenös verabreicht. 5 bis 5,5 h nach der Injektion wurden die Tiere durch intravenöse Verabreichung von 10 ml Doletal getötet. Innerhalb von 60 min nach ihrem Exitus wurden sämtliche Organe/Gewebe präpariert und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff stabilisiert.

Bei der weiteren Verarbeitung wurden Proben der einzelnen tiefgefrorenen Gewebe (1g) unter Stickstoffkühlung mit 1,5 ml Puffer A (50mM Tris/HCl, pH 7,1, 100mM KCl, 20% Glycerol) versetzt und in einem Porzellanmörser zu einem Mehl pulverisiert (vgl. J.Klose, "Fractionated Extraction of Total Tissue Proteins from Mouse and Human for 2-D Electrophoresis", in: Methods in Molecular Biology, Vol.112: 2-D Proteome Analysis Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ). Nach einer anschließenden 1-stündigen Zentrifugation bei 100.000 g und +4°C wurde der erhaltene Überstand gewonnen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2. Proteomanalyse unter Verwendung cytoplasmatischer Gehirnpoteine von Pavianen.

Cytoplasmatische Gehirnzellproteinextrakte von einerseits gesunden Pavianen (Kontrolle) und andererseits Pavianen,

denen LPS injiziert worden war, wurden im Rahmen einer Proteomanalyse verwendet. Bei der einleitenden analytischen 2D-Gelelektrophorese wurde Gehirnextrakt, 100 μ g Protein enthaltend, auf 9M Harnstoff, 70 mM DTT, 2% Ampholyt pH 2-4 eingestellt und dann mittels analytischer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, wie in J.Klose, et al., "Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome", Electrophoresis 1995, 16, 1034-1059; beschrieben ist. Die Sichtbarmachung der Proteine im 2D-Elektrophoresegele erfolgte mittels Silverstaining (vgl. J.Heukeshoven, et al., "Improved silver staining procedure for fast staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl gels", Electrophoresis 1988, 9, 28-32).

Zur Auswertung wurden die Proteinspotmuster der Proben behandelter Tieren mit den Proteinspotmustern verglichen, die aus Gehirngewebeproben unbehandelter Tiere resultierten. Ferner wurden die Proteinspotmuster aus dem Gehirngewebe behandelter Tiere auch mit denen anderer Gewebe derselben behandelten Tiere verglichen (die Ergebnisse sind nicht im Einzelnen gezeigt). Substanzen, die bei keiner Kontrollprobe, aber bei allen behandelten Tieren zusätzlich auftraten, wurden für weitere analytische Untersuchungen selektiert. Fig. 1 zeigt einen Vergleich der 2D-Elektrophoresegele für eine Kontrollprobe (A) und eine Probe eines behandelten Tieres (B), wobei der zusätzliche Proteinspot in (B) einem neuen Protein entspricht, dessen Position durch einen Pfeil und einen Kreis hervorgehoben ist.

Die im Proteinspotmuster der analytischen 2D-Gelelektrophorese identifizierten neuen spezifischen Proteine wurden dann anschließend mittels präparativer 2D-Gelelektrophorese unter Einsatz von 350 μ g Protein präpariert (vgl. wiederum (10)). Bei der präparativen 2D-Gelelektrophorese erfolgte die Färbung mittels Coomassie Brilliant Blue G250 (vgl. V.Neu-hoff, et al., "Improved staining of proteins in polyacryla-

mide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250", Electrophoresis 1988, 9, 255-262).

Die für die weitere Analyse vorselektierten Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, unter Anwendung der Methode, die in A.Otto, et al., "Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry", Electrophoresis 1996, 17, 1643-1650; beschrieben ist, trypsinverdaut und anschließend massenspektroskopisch analysiert und zwar unter Anwendung massenspektrometrischer Untersuchungen, wie sie z.B. in G.Neubauer, et al., "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex", in: nature genetics vol. 20, 1998, 46-50; J.Lingner, et al., "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase", in: Science, Vol.276, 1997, 561-567; M.Mann, et al., "Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases", in: TRENDS in Biochemical Sciences, Vol.26, 1, 2001, 54-61; beschrieben und diskutiert werden. Die trypsinverdauten Proben wurden einer MALDI-TOF Massenspektrometrie unterzogen.

3. Identifizierung von LASP-1

Wie in den Figuren 1(A) und 1(B) gezeigt ist, findet sich in Gehirngewebeextrakten von Pavianen, denen eine LPS-Injektion verabreicht worden war, u.a. ein Spot eines Proteins, für das aufgrund der Gelektrophoresedaten im Vergleich mit Markersubstanzen mit bekanntem Molekulargewicht ein Molekulargewicht von ca. 36 ± 3 kDa abgeschätzt wurde, während aus der relativen Position des Proteins aus der ersten Dimension ein isoelektrischer Punkt von ca. 6,6-7,0 ermittelt wurde.

Bei der Massenanalyse des tryptischen Verdaus des neuen Proteinspots wurde für 21 Bruchstücke unter Rückgriff auf

Datenbankinformationen der Versuch einer Zuordnung zu Peptiden vorgenommen. Im Ergebnis entsprachen zwölf der erhaltenen Zuordnungen Bruchstücken der Proteinkette des Phosphoproteins LASP-1 (SEQ ID NO:1). Die sog. "Sequence Coverage" betrug 38%, was nach den anerkannten fachüblichen Kriterien als eindeutige Identifizierung des in dem Spot enthaltenen Proteins als Proteinkette von LASP-1 anzusehen ist.

So konnten z.B. die folgenden Massen Bruchstücken der LASP-1-Proteinkette (SEQ ID NO.1) zugeordnet werden: 1202,714; 1254,615; 1291,745; 1360,813; 1418,898; 1443,959; 1489,826; 1551,943; 1604,040; 1608,960; und zwar war die Zuordnung gemäß MS-Fit 3.3.1. Protein Prospector 3.4.1., Database NCBI Nr. 7.25.2002 wie folgt:

Die Masse 1202,714 (MH^+) entspricht der Sequenz QQSELQSQVR (SEQ ID NO:2). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1201,604. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 76-95 wieder.

Die Masse 1254,615 entspricht der Sequenz ACFHCETCK (SEQ ID NO:3). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1253,498. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 28-36 wieder.

Die Masse 1291,745 entspricht der Sequenz KPYCNAHYPK (SEQ ID NO:4). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1290.617. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 50-59 wieder.

Die Masse 1360,813 entspricht der Sequenz VNCLDKFWHK (SEQ ID NO:5). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1359,675. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 18-27 wieder.

Die Masse 1418,898 entspricht der Sequenz GFSVVADTPELQR (SEQ

ID NO:6). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1417,719. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 97-109 wieder.

Die Masse 1443,959 entspricht der Sequenz LKQQSELQSQVR (SEQ ID NO:7). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1442,783. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 74-85 wieder.

Die Masse 1489,826 entspricht der Sequenz MGPSGGEGMEPERR (SEQ ID NO:8). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1488,644. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 131-144 wieder.

Die Masse 1551,943 entspricht der Sequenz TGDTGMLPANYVEAI (SEQ ID NO:9). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1550,728. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 247-261 wieder.

Die Masse 1604,040 entspricht der Sequenz GKGFSVVADTPELQR (SEQ ID NO:10). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1602,836. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 95-109 wieder.

Die Masse 1608,960 entspricht der Sequenz QSFTMVADTPENLR (SEQ ID NO:11). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1607,761. In der Aminosäuresequenz von LASP-1 findet sich diese Sequenz an den Positionen 60-73 wieder.

Eine solche Übereinstimmung gilt nach anerkannten Interpretationsgrundsätzen als sichere Identifizierung des Produkts aus dem Proteinspot als LASP-1. Das Molekulargewicht

von unphosphoryliertem LASP-1 (261 Aminosäuren; vgl. SEQ ID NO:1) beträgt 29 717 Dalton. Das nachgewiesene Protein muß daher in einer post-translational prozessierten Form (glykosyliert sowie ggf. phosphoryliert) vorgelegen haben.

Die erstmals festgestellten erhöhten LASP-1-Konzentrationen erlauben dessen Verwendung als neuer Biomarker für Sepsis und Entzündungen, insbesondere infektiöse Entzündungen.

EPO-Munich
33
19. April 2002

Patentansprüche

1. Verfahren zur Früherkennung und Erkennung, für die Verlaufsprognose und die Beurteilung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung von Entzündungserkrankungen und Infektionen, insbesondere sepsisähnlichen systemischen Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Anwesenheit und/oder Menge des Proteins LASP-1 in einer biologischen Flüssigkeit oder einer Gewebeprobe eines Patienten bestimmt und aus dessen Anwesenheit und/oder Menge Schlüsse hinsichtlich des Vorliegens, des zu erwartenden Verlaufs, des Schweregrads oder des Erfolgs einer Therapie der Entzündungserkrankung oder der Infektion zieht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine posttranslational gebildete lösliche Form von LASP-1 bestimmt, und das LASP-1-Protein bei seiner Bestimmung ein- oder mehrfach phosphoryliert oder in nicht-phosphoryliert vorliegt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Flüssigkeit Blut, eine Blutfraktion oder Liquor cerebrospinalis ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es ein immundiagnostisches Bestimmungsverfahren (Immunoassay) ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Entzündungserkrankung eine entzündliche Erkrankung des Gehirns, insbesondere die Alzheimer Krankheit, ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es im Rahmen einer Multiparameter-Bestim-

mung durchgeführt wird, bei der gleichzeitig mindestens ein weiterer Entzündungs- oder Infektionsparameter bestimmt wird und bei der ein Messergebnis in Form eines Satzes von mindestens zwei Messgrößen gewonnen wird, der zur Feindiagnostik der Entzündung oder Infektion ausgewertet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass im Rahmen der Multiparameter-Bestimmung neben LASP-1 wenigstens ein weiterer Parameter bestimmt wird, der ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Procalcitonin, CA 125, CA 19-9, S100B, S100A-Proteinen, löslichen Cytokeratin-Fragmenten, insbesondere CYFRA 21, TPS und/oder löslichen Cytokeratin-1-Fragmenten (sCY1F), den Peptiden Inflammin und CHP, Peptid-Prohormonen, der Glycin-N-Acyltransferase (GNAT), der Carbamoylphosphat Synthetase 1 (CPS 1) und dem C-reaktiven Protein (CRP) oder Fragmenten davon.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Multiparameter-Bestimmung als Simultanbestimmung mittels einer Chiptechnologie-Messvorrichtung oder einer immunchromatographischen Messvorrichtung erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung des mit der Messvorrichtung gewonnenen komplexen Messergebnisses mit Hilfe eines Computerprogramms erfolgt.

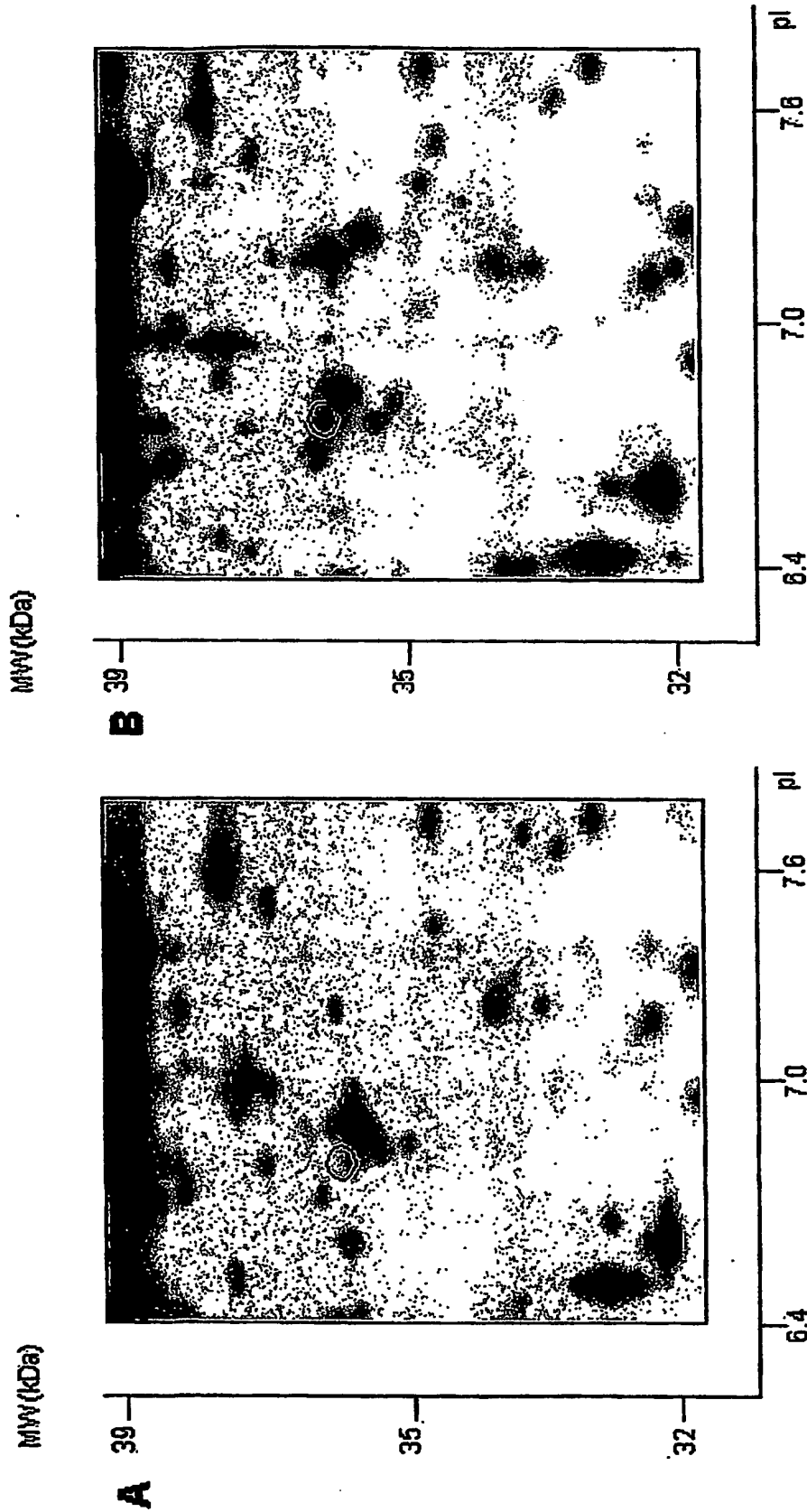
EPO - Munich
33
19. April 2002

Zusammenfassung

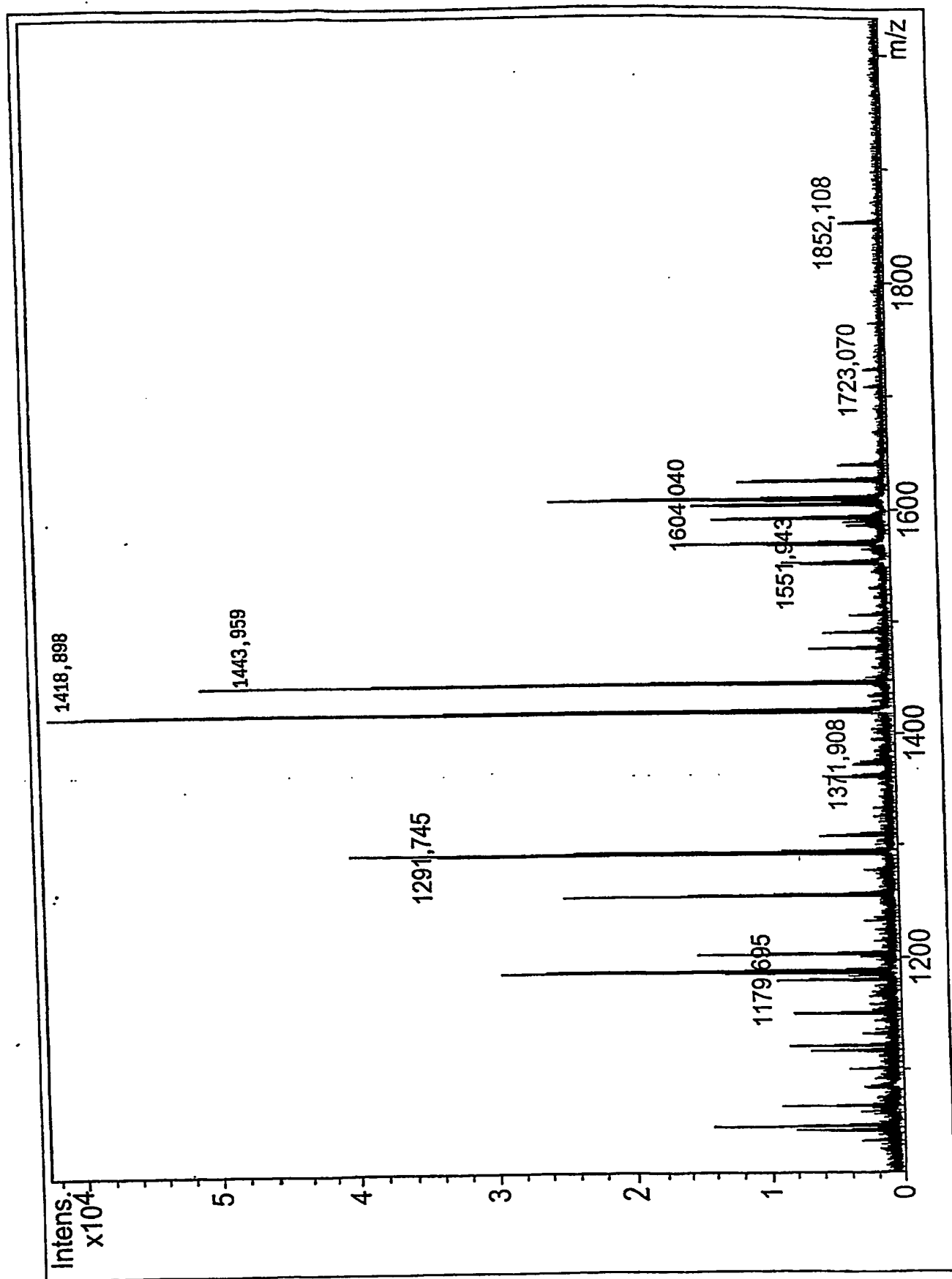
Verfahren zur Diagnose von Entzündungserkrankungen und Infektionen unter Bestimmung des Phosphoproteins LASP-1 als Inflammationsmarker

Verfahren zur Früherkennung und Erkennung, für die Verlaufsprognose und die Beurteilung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung von Entzündungserkrankungen und Infektionen, insbesondere von Sepsis und sepsis-ähnlichen systemischen Infektionen sowie von Entzündungserkrankungen, die im Gehirn lokalisiert sind, einschließlich der Alzheimer Krankheit, oder die auf das Gehirn übergreifen, bei dem man die Anwesenheit und/oder Menge einer Expressionsform des Phosphoproteins LASP-1 in einer biologischen Flüssigkeit auf Blut- oder Liquorbasis oder in einer Gewebeprobe eines Patienten bestimmt und aus der Anwesenheit und/oder Menge von LASP-1 Schlüsse hinsichtlich des Vorliegens, des zu erwartenden Verlaufs, des Schweregrads oder des Erfolgs einer Therapie der Entzündungserkrankung oder der Infektion zieht.

EPO - Munich
33
19. April 2002



Figur 1



Figur 2

EPO - Munich
33
19. April 2002

SEQUENCE LISTING

<110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft

<120> Verfahren zur Diagnose von Entzündungserkrankungen und Infektionen unter Bestimmung des Phosphoproteins LASP-1 als Inflammationsmarker

<130> 3677 AS

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Asn	Pro	Asn	Cys	Ala	Arg	Cys	Gly	Lys	Ile	Val	Tyr	Pro	Thr	Glu
1				5					10					15	
Lys	Val	Asn	Cys	Leu	Asp	Lys	Phe	Trp	His	Lys	Ala	Cys	Phe	His	Cys
		20						25					30		
Glu	Thr	Cys	Lys	Met	Thr	Leu	Asn	Met	Lys	Asn	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Glu
		35					40					45			
Lys	Lys	Pro	Tyr	Cys	Asn	Ala	His	Tyr	Pro	Lys	Gln	Ser	Phe	Thr	Met
	50					55					60				
Val	Ala	Asp	Thr	Pro	Glu	Asn	Leu	Arg	Leu	Lys	Gln	Gln	Ser	Glu	Leu
65					70					75					80
Gln	Ser	Gln	Val	Arg	Tyr	Lys	Glu	Glu	Phe	Glu	Lys	Asn	Lys	Gly	Lys
				85					90					95	
Gly	Phe	Ser	Val	Val	Ala	Asp	Thr	Pro	Glu	Leu	Gln	Arg	Ile	Lys	Lys
			100					105					110		
Thr	Gln	Asp	Gln	Ile	Ser	Asn	Ile	Lys	Tyr	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Lys
		115					120					125			
Ser	Arg	Met	Gly	Pro	Ser	Gly	Gly	Glu	Gly	Met	Glu	Pro	Glu	Arg	Arg
	130					135					140				
Asp	Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	Ser	Tyr	Arg	Arg	Pro	Leu	Glu	Gln	Gln	Gln
145					150					155				160	
Pro	His	His	Ile	Pro	Thr	Ser	Ala	Pro	Val	Tyr	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln
				165					170					175	
Gln	Pro	Val	Ala	Gln	Ser	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Lys	Glu	Pro	Ala	Ala	Pro
			180					185						190	
Val	Ser	Ile	Gln	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg
		195					200					205			
Ala	Val	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Ala	Ala	Asp	Glu	Asp	Glu	Val	Ser	Phe	Gln
210						215					220				

Asp Gly Asp Thr Ile Val Asn Val Gln Gln Ile Asp Asp Gly Trp Met
225 230 235 240

Tyr Gly Thr Val Glu Arg Thr Gly Asp Thr Gly Met Leu Pro Ala Asn
245 250 255

Tyr Val Glu Ala Ile
260

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Gln Gln Ser Glu Leu Gln Ser Gln Val Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Ala Cys Phe His Cys Glu Thr Cys Lys
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Lys Pro Tyr Cys Asn Ala His Tyr Pro Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Val Asn Cys Leu Asp Lys Phe Trp His Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Gly Phe Ser Val Val Ala Asp Thr Pro Glu Leu Gln Arg
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Leu Lys Gln Gln Ser Glu Leu Gln Ser Gln Val Arg
1 5 10

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Gly Pro Ser Gly Gly Glu Gly Met Glu Pro Glu Arg Arg
1 5 10

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Thr Gly Asp Thr Gly Met Leu Pro Ala Asn Tyr Val Glu Ala Ile
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Gly Lys Gly Phe Ser Val Val Ala Asp Thr Pro Glu Leu Gln Arg
1 5 10 15

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Gln Ser Phe Thr Met Val Ala Asp Thr Pro Glu Asn Leu Arg
1 5 10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.